



УДК 577.112.7:612.115

ТРАНСФЕРИН ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ МАРКЕР ДЛЯ ДІАГНОСТУВАННЯ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Н. Г. Ракша, В. В. Конопельнюк, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко

*Навчально-науковий центр "Інститут біології"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна
e-mail: nkudina@ukr.net*

Труднощі діагностування хронічної форми алкогольної інтоксикації обумовлюють актуальність пошуку специфічного та надійного тесту в разі підозри на систематичне вживання значних доз алкоголю. Як потенційний маркер для діагностування алкоголізму нами було вибрано вуглеводдефіцитний трансферин, який визначали методом іонообмінної хроматографії. Відповідно до одержаних нами результатів на 3, 7 та 11 добу розвитку хронічної алкогольної інтоксикації в сироватці крові щурів спостерігали зниження рівня тетрасіалотрансферину на тлі зростання вмісту фракцій моносіало- та дисіалоізоформ трансферину. Хроматографічний аналіз фракцій трансферину на 10 добу після припинення вживання алкоголю виявив нормалізацію рівня тетрасіалоізоформ при збереженні підвищеного вмісту вуглеводдефіцитного трансферину. Отже, комплексне визначення вуглеводдефіцитного трансферину та його тетрасіалоізоформи можна рекомендувати як високоінформативний метод діагностики хронічної алкогольної інтоксикації, моніторингу й об'єктивізації оцінки ремісії, а також для своєчасного виявлення можливих рецидивів.

Ключові слова: ізоформи трансферину, діагностичний маркер, хронічна алкогольна інтоксикація.

ВСТУП

Своєчасне діагностування алкоголізму, зокрема, його ранніх чи латентних форм часто є вкрай необхідним для постановки адекватного діагнозу та призначення відповідної терапії для лікування синдрому алкогольної залежності й соматичних патологій алкогольного генезу. Ситуація значно ускладнюється відсутністю чітких лабораторних показників, які надавали б інформацію саме про хронічну стадію алкоголізму, та небажанням пацієнтів співпрацювати, адже відомо, що у клініко-діагностичному і терапевтичному аспекті хворі, що страждають від алкогольної залежності, належать до однієї з найскладніших груп. Більшість із них або заперечують факт вживання алкоголю, або значно применшують його кількість. За

подібних умов ефективність реалізації профілактичних заходів і програм соціально-побутової реабілітації знижується, що в кінцевому результаті не лише призводить до зростання термінів тимчасової недієздатності, а й слугує однією з причин ранньої інвалідизації та смертності.

На сьогодні діагностувати гостру алкогольну інтоксикацію значно простіше, ніж виявити її хронічний перебіг, особливо після припинення вживання алкогольних напоїв, оскільки у цьому разі більшість показників або вже повертаються до фізіологічних значень, або є недостатньо специфічними саме для даної патології, і це не дає змоги однозначно стверджувати про факт тривалого зловживання. Поява в крові та біологічних рідинах організму етанолу і його прямих метаболітів (так званих безпосередніх маркерів) [1, 11, 17] через їх короткий період напіврозпаду не може розглядатись як об'єктивний критерій для ідентифікації та розмежування стану алкогольного сп'яніння, спричиненого разовим споживанням алкоголю та стану хронічної алкогольної інтоксикації. Група непрямих маркерів [2, 17] оцінювання алкогольного статусу включає широкий спектр показників, аналітичні характеристики і діагностична значимість яких значно варіюють. Наприклад, функціональні проби печінки, які широко використовують у клінічній практиці для підтвердження систематичного вживання алкогольних напоїв, характеризуються відносно низькою специфічністю, оскільки дають хибні позитивні результати у разі органічних пошкоджень гепатоцитів чи посилення синтезу мікосомальних ферментів у відповідь на розвиток патологій як алкогольного, так і неалкогольного ґенезу [4].

Беручи до уваги вищезазначене, пошук і розроблення високоточних методів діагностування саме хронічного перебігу алкоголізму, диференціювання ступеня і тривалості вживання алкоголю, контролю за хворими на стадії лікування і реабілітації не втрачає наразі своєї актуальності. Ідеальний маркер має бути специфічним, тобто не залежати від фізіологічного статусу організму, не змінюватися при захворюваннях неалкогольної етіології та мати достатню чутливість, щоб реагувати на вживання алкоголю навіть у незначних кількостях. Серед існуючих лабораторних критеріїв оцінювання хронічної алкогольної інтоксикації визначення вуглеводдефіцитного трансферину вважається одним із найбільш інформативних і надійних тестів при підозрі на хронічне споживання значних доз алкоголю [7]. Специфічне зростання концентрації вуглеводдефіцитного трансферину спостерігається у разі систематичного вживання 50–80 г етанолу на добу не менше 7 днів і зберігається впродовж 14 діб після припинення його надходження [2]. До безумовних переваг визначення вмісту вуглеводдефіцитного трансферину, порівняно з іншими тестами, зараховують його високу специфічність (близько 90 %) та чутливість (від 20 до 100 % залежно від методу детекції) [2, 7, 13]. Цей маркер не змінюється при хворобах печінки неалкогольного походження, на нього майже не впливає застосування лікарських препаратів. Зростання рівня вуглеводдефіцитного трансферину не фіксується за одноразового вживання значної дози алкоголю або у разі споживання помірних доз. Трансферин – білок сироватки крові, який синтезується у клітинах печінки та забезпечує транспортування іонів заліза до кісткового мозку, печінки, селезінки. Значна варіабельність структурних доменів (власне поліпептидного ланцюга, сайтів зв'язування іонів заліза і комплексів N-гліканів) у молекулі трансферину [2, 13, 15] обумовлює гетерогенність пулу молекул трансферину. З позицій діагностування алкоголізму найбільший інтерес викликає варіабельність

його структури на рівні вуглеводневих ланцюгів. За фізіологічних умов трансферин представлений сукупністю ізоформ, які різняться за ступенем сіалування вуглеводневих ланцюгів. Залежно від кількості приєднаних залишків сіалової кислоти може існувати до 9 варіантів трансферину, починаючи від асіало- і закінчуючи октасіалотрансферином [2]. Із них лише пента-, тетра-, три- і дисіалотрансферини циркулюють у кількостях, які можна визначити. За відсутності дії патологічного агента асіало-, моносіало- й октасіалотрансферини не детектуються або виявляються в незначних концентраціях (<0,5% і <0,9% відповідно для асіало- і моносіалотрансферину) [6, 13].

З метою уточнення спектра ізоформ трансферину, які могли би слугувати адекватним показником для діагностування хронічної стадії алкоголізму, нами було проаналізовано появу крайніх, за відсотковим вмістом у здорових людей, форм вуглеводдефіцитного трансферину в динаміці розвитку хронічної алкогольної інтоксикації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г, яких утримували в умовах стандартного раціону віварію. Загальна кількість тварин, використаних в експерименті, становила 30. Усі маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин та згідно з етичними нормами, прийнятими Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року). Модель експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації у піддослідних тварин відтворювали згідно з методом [14] внутрішньошлунковим введенням упродовж 11 діб 30% етилового спирту з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини. Контрольну групу становили щурі, яким внутрішньошлунково вводили воду, котру використовували для розведення етанолу.

Сироватку крові одержували з цільної крові щурів. Для вилучення фібриногену та супутніх білків кров витримували протягом 60 хв у термостаті при 37 °С. Сироватку відбирали після центрифугування зразків при 600 г упродовж 40 хв.

Іонообмінну хроматографію проводили на хроматографі BioLogic ("BioRad", США) з вбудованим оптичним блоком, межі точності якого коливаються в діапазоні від 0,001 до 2 AU. Хроматографічне розділення аналізованих зразків на колонці з Q-сефарозою здійснювали відповідно до методу [14] з використанням елюентів із різними значеннями рН і змінним ступеневим градієнтом буферів (табл. 1), де елюент А – це буфер нанесення. Ступінчасте внесення елюенту В під час хроматографічного розділення зразків забезпечувало селективність десорбції цільових молекул трансферину з хроматографічного носія. Елюент С використовували для відмивання неспецифічних білків. Для насичення трансферину сироватки залізом до зразків додавали 0,5 М NaHCO₃ та 0,01 М FeCl₃, ретельно перемішували і залишали на ніч при 8 °С. Для осадження ліпопротеїнів зразки змішували з декстран сульфатом (100 г/л), 1 М CaCl₂ та інкубували впродовж 30-60 хв при 8 °С з подальшим центрифугуванням 10 хв при 10 000 г. Одержану надосадову рідину розбавляли водою в 5 разів і використовували для подальшої роботи. З метою одержання фракцій ізоформ трансферину проби у 0,02 М *трис*-HCl буфері (рН 6,5) наносили на колонку зі швидкістю 1 мл/хв. Елюцію проводили, використовуючи ступеневий

градієнт буферів: елюент А (0,02 М *трис*-HCl буфер), елюент В (0,35 М NaCl), елюент С (1 М NaCl). Під час елюції контролювали зміну поглинання за довжини хвилі 450 нм, яка відповідає селективному поглинанню комплексу трансферин-залізо.

Таблиця 1. Ступеневий градієнт буферів для розділення ізоформ трансферину

Табле 1. Gradient profile used for separation of transferrin isoforms

Час, хв	Елюент А, %	Елюент В, %	Елюент С, %
0,0	90	10	0
3,0	90	10	0
3,1	85	15	0
7,0	85	15	0
18,0	70	30	0
18,1	0	0	100
22,0	0	0	100
22,1	90	10	0
32,0	90	10	0

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Діагностична значимість виявлення вуглеводдефіцитного трансферину й ефективність його практичного застосування визначається особливостями методу, що лежить в основі детекції даного показника. Застосований нами метод іонообмінної хроматографії дає змогу проводити візуальну та кількісну оцінку як сумарного трансферину, так і його окремих ізоформ [12, 16].

У результаті проведених нами досліджень (рис. 1) було показано, що у контрольній групі тварин трансферин представлений переважно тетрасіалоізоформою, що узгоджується з даними літератури [13, 15, 16], відповідно до яких відсотковий вміст даної ізоформи становить 64–80 % від загального пулу трансферину. Систематичне вживання алкогольних напоїв призводить до зміни співвідношення ізоформ трансферину в бік накопичення низькосіалованих молекул – моносіало-, дисіалоізоформ або появи повністю десіалованого трансферину. Сумарно їх оцінюють як вуглеводдефіцитний трансферин. Діагностична значимість визначення трисіалотрансферину викликає сумніви, оскільки саме дана ізоформа не є специфічною для хронічного перебігу алкоголізму [5, 10].

Як видно з графіка, представленого на рис. 1, А, на 3 добу розвитку хронічної алкогольної інтоксикації у сироватці крові щурів реєструється зростання частки вуглеводдефіцитного трансферину, зокрема, його моно- та дисіалоізоформ на фоні зниження вмісту тетрасіалотрансферину. Накопичення за умов хронічного зловживання алкоголем вуглеводдефіцитного трансферину можна пояснити токсичною дією етанолу і/або його метаболіту – ацетальдегіду, патологічними перебудовами метаболізму, одним із проявів яких є порушення реакцій глікозилювання білків [3, 6]. Оскільки варіабельність молекул трансферину певною мірою визначається структурою ланцюгів N-гліканів, які різняться за ступенем галузнення, порушення процесів глікозилювання призводить до синтезу молекул із меншою кількістю ланцюгів. У роботах [2, 7] продемонстровано здатність ацетальдегіду впливати на синтез ланцюгів N-гліканів трансферинів в апараті Гольджі гепатоцитів. Подібний ефект реалізується завдяки безпосередньому інгібуванню ацетальдегідом активності ферментів N-ацетилглюкозамін- і галактозилтрансферази.

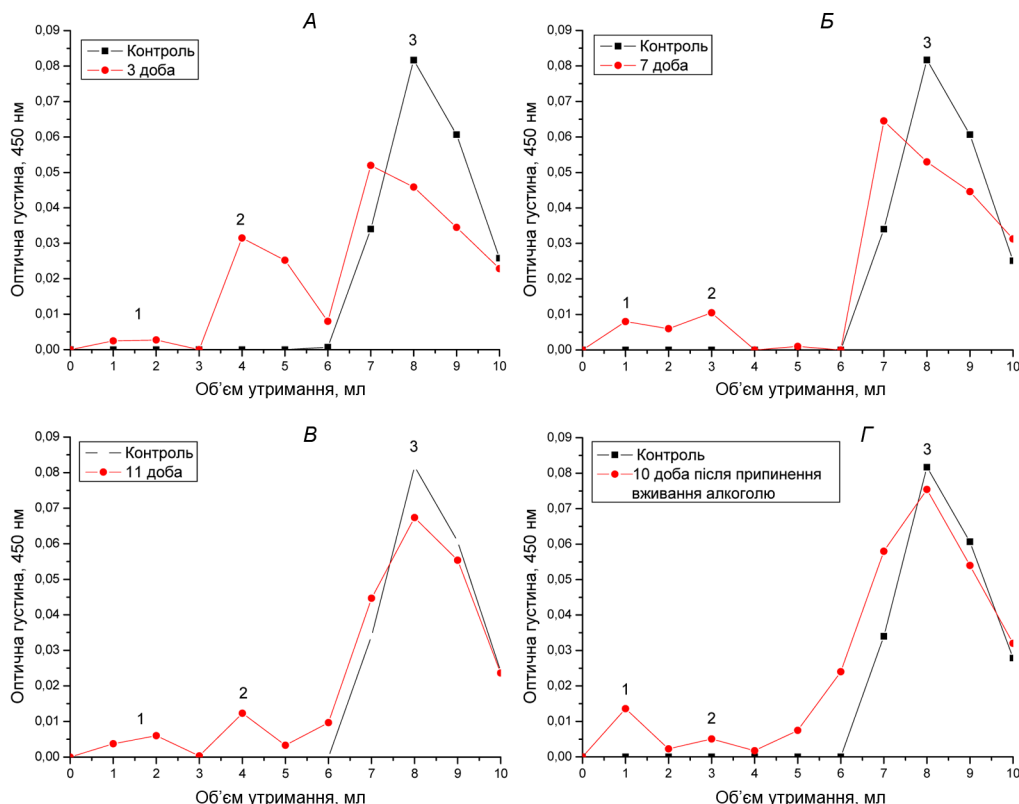


Рис. 1. Типова хроматограма розділення фракцій ізоформ трансферину в динаміці розвитку хронічної алкогольної інтоксикації (А, Б, В) та після припинення вживання алкоголю (Г): 1 – моносіалотрансферин; 2 – дисіалотрансферин; 3 – тетрасіалотрансферин

Fig. 1. Typical chromatogram separation of transferrin isoforms of under development of chronic alcohol intoxication (A, B, B) and after cessation of alcohol (Г): 1 – monosialotransferrin; 2 – disialotransferrin; 3 – tetrasialotransferrin

З'ясоване нами подальше зростання вмісту фракції моносіалотрансферину на 7 добу (рис. 1, Б) розвитку хронічної алкогольної інтоксикації може бути результатом зниження ступеня сіалування молекул трансферину. Слід зазначити, що, на відміну від більшості глікопротеїнів, недостатнє сіалування ізоформ трансферину ніяк не пов'язане з кліренсом печінки чи нирок і є результатом пригнічення активності ферменту 2,6-сіалілтрансферази [2].

Окрім, власне, пригнічення глікозилування, нами відмічено зниження вмісту тетрасіалотрансферинів у всі досліджувані терміни розвитку хронічної алкогольної інтоксикації (3, 7, 11 доба), що може бути наслідком активування реакцій десіалування. На це вказує накопичення в сироватці та біологічних рідинах хворих на алкоголізм сіалових кислот [9]. Так, авторами роботи показано [8], що хронічне вживання алкоголю обумовлює підвищення в клітинах печінки активності цитозольної і асоційованої з плазматичною мембраною форми ферменту сіалідази.

На рис. 1, Г наведено графік хроматографічного розділення сироватки крові щурів на 10 добу після припинення вживання тваринами алкоголю. Наближення

рівня тетрасіалотрансферину до контрольних значень свідчить про певну нормалізацію процесів глікозилювання та сіалування білків, у той час як наявність на хроматограмі піків, характерних для моно- і дисіалотрансферинів, можна пояснити, зважаючи, що період напіврозпаду трансферинів триває до двох тижнів.

ВИСНОВКИ

Таким чином, одержані нами результати дають підстави стверджувати, що комплексне визначення вуглеводдефіцитного трансферину та його тетрасіалоізоформи може бути використане як високоточний метод діагностування хронічної алкогольної інтоксикації, моніторингу й об'єктивізації оцінки ремісії, а також для своєчасного виявлення можливих рецидивів.

1. *Anton R.F.* Editorial commentary: alcohol biomarker papers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2010; 34(6): 939–940.
2. *Arndt T.* Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 13–27.
3. *Chrostek L., Cylwik B., Szmitkowski M.* The effect of ethanol on the protein glycosylation. Part 2. Impairment of the glycoproteins endocytosis. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2006; 116(3): 881–7.
4. *Conigrave K.M., Degenhardt L.J., Whitfield J.B.* et al. CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA Collaborative Project. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2002; 26: 332–339.
5. *Dibbelt L.* Does trisialo-transferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin. Chem.*, 2000; 46: 1203–1205.
6. *Flahaut C., Michalski J.C., Danel T.* et al. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. *Glycobiology*, 2003; 13: 191–8.
7. *Fleming M.F., Anton R.F., Spies C.D.* A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2004; 28: 1347–55.
8. *Garige M., Azuine M.A., Lakshman M.R.* Chronic ethanol consumption upregulates the cytosolic and plasma membrane sialidase genes, but down regulates lysosomal membrane sialidase gene in rat liver. *Metabolism*, 2006; 55(6): 803–810.
9. *Ghosh P., Hale E.A., Lakshman M.R.* Plasma sialic-acid index of apolipoprotein J (SIJ): a new alcohol intake marker. *Alcohol*, 2001; 25(3): 173–179.
10. *Gressner O.A., Jafari S., Erkens M.* et al. Evaluation of serum percent trisialotransferrin as potential predictive biomarker of hepatocellular dedifferentiation in chronic liver disease. *Clin. Chim. Acta*, 2009; 403(1–2): 188–93.
11. *Hannuksela M.L., Liisanantti M.K., Nissinen A.E.* et al. Biochemical markers of alcoholism. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007; 45(8): 953–961.
12. *Helander A., Husa A., Jeppsson J-O.* Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin. Chem.*, 2003; 49: 1881–1890.
13. *Jong G., van Dijk J.P., van Eijk H.G.* The biology of transferrin. *Clin. Chim. Acta*, 1990; 190: 1–46.
14. *Khalilov M.H., Zakihordzhaev S.Y.* On the characterization of certain pathochemical shifts in blood, liver and brain in experimental alcohol intoxication. *Questions Alcoholism Clinic: Sat scientific. tr.*, Tashkent, 1983; 38–41.
15. *Maksic N., Vodnik T., Milovanovic S.* et al. Carbohydrate-deficient transferring – a contemporary biomarker in comparison with traditional laboratory markers of chronic alcohol abuse. *JMB*, 2010; 29: 95–101.

16. Renner F., Rolf-Dieter Kanitz R-D. Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. **Clinical Chemistry**, 1997; 43(3): 485–490.
17. Torrente M.P., Freeman W.M., Vrana K.E. Protein biomarkers of alcohol abuse. **Expert Rev. Proteomics**, 2012; 9(4): 425–436.

TRANSFERRIN AS A POTENTIAL MARKER FOR CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION DIAGNOSIS

N. G. Raksha, V. V. Konopelniuk, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko

Educational and Scientific Center "Institute of Biology"

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine

e-mail: nkudina@ukr.net

There are certain difficulties associated with identification of chronic alcohol intoxication that cause the relevance of search of specific and reliable laboratory test for individuals suspected in systematic use of significant amounts of alcohol. As a potential marker for alcoholism confirm action have chosen the carbohydrate-deficient transferrin, which was determined by ion-exchange chromatography. In accordance with our results on 3, 7 and 11 days of development of chronic alcohol intoxication reduction of tetrasialotransferrin isoform with increase of monosialo- and disialoisoform transferrin content in blood serum of experimental animals was observed. Chromatographic analysis of transferrin fractions on 10th day after cessation of alcohol revealed normalization of tetrasialoisoform level with maintaining of carbohydrate-deficient transferrin content above control values. Thus, a comprehensive analysis of carbohydrate-deficient transferrin and its tetrasialoisoform can be recommended as highly informative method for chronic alcohol intoxication diagnosis, monitoring remission and timely identification of possible relapses.

Keywords: transferrin isoforms, diagnostic marker, chronic alcohol intoxication.

ТРАНСФЕРРИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Н. Г. Ракша, В. В. Конопельнюк, А. Н. Савчук, Л. И. Остапченко

Учебно-научный центр "Институт биологии"

Киевского национального университета имени Тараса Шевченко

ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина

e-mail: nkudina@ukr.net

Определенные сложности при диагностировании хронической алкогольной интоксикации обуславливают актуальность поиска специфического и надежного теста при подозрении на систематическое употребление значительных количеств алкоголя. Как потенциальный маркер для подтверждения алкоголизма нами был выбран углеводдефицитный трансферрин, который определяли методом ионообменной хроматографии. В соответствии с полученными нами результатами на 3, 7 и 11 сутки развития хронической алкогольной интоксикации в сыворотке крови

экспериментальных животных наблюдали снижение уровня тетрасиалотрансферрина на фоне увеличения содержания фракций моносиало- и дисиалоизоформ трансферрина. Хроматографический анализ фракций трансферрина на 10 сутки после прекращения употребления алкоголя показал нормализацию уровня тетрасиалоизоформ при сохранении уровня углеводдефицитного трансферрина выше контрольных значений. Таким образом, комплексное определение уровня углеводдефицитного трансферрина и его тетрасиалоизоформ можно рекомендовать как высокоинформативный метод диагностирования хронической алкогольной интоксикации, мониторинга ремиссии и своевременного выявления возможных рецидивов.

Ключевые слова: изоформы трансферрина, диагностический маркер, хроническая алкогольная интоксикация.

Одержано: 19.06.2014